

無かった。PdpC タンパク質の機能を推測するために、DNASIS Pro と PROSITE を用いて解析を行ったところ PdpC の分子量は 156, 186 で、pI は 9.4 であり、巨大な強塩基性タンパク質であることが明らかとなった。このような性状を持つ類似タンパク質を検索したところ、DNA-directed RNA polymerase subunit beta、eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A、translation initiation factor IF-2、regulator of G-protein signaling protein-like、telomerase reverse transcriptase 等の核酸結合性タンパク質が主だった。このことから、PdpC タンパク質も核酸に関連するタンパク質である可能性が考えられる。

本研究により、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子は病原性に関与している可能性を明らかにした。今後 PdpC タンパク質の機能を解析し、病原性発現機序の解明を行っていきたい。

E. 結論

野兔病菌の病原性を規定する遺伝子を明らかにするために弱毒および強毒性株を作出し、全ゲノム配列の比較を行った。この結果、190 万塩基対におよぶゲノムの中で *pdpC* 遺伝子 ORF に 1 塩基の差異が見つかり、野兔病菌 *pdpC* 遺

伝子は病原性に深く関与している可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Francisella tularensis subspecies *tularensis* SCHU 株の強毒性に関わる遺伝子の同定。宇田晶彦，関塚剛史，藤田修，黒田誠，堀田明豊，山本美江，棚林清，山田章雄。第33回日本分子生物学会年会、2010年12月（神戸）

pdpC gene determines the virulence of *Francisella tularensis*. K Tanabayashi, A Uda, T Sekizuka, O Fujita, M Kuroda, A Hotta, Y Yamamoto, N Sugiura, and A Yamada. 1st International One Health Congress、2011年2月（Melbourne）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. PCR およびシーケンス解析に用いたプライマー

プライマー名	ゲノム上の位置 ^a	5'→3' プライマー配列	増幅サイズ (bp)
FTT_1354 or FTT_1709/ hypothetical protein (<i>pdpC1</i> or <i>pdpC2</i>)			467
FT-1394871-1394879-L	1,394,491	TCATCTCAAATCAAGCCAAGC	
FT-1394871-1394879-R	1,394,957	TCGACACTATGTGCCATGAAA	
Pathogenicity island 1 and flanking regions			36,854
PI1F	1,373,404	TCATAATTCGTAACCTCACAGAAACA	
PI1R	1,410,247	CAACGCTATGAGAGTGGTGAGT	
Pathogenicity island 2 and flanking regions			36,301
PI2F	1,765,833	CAAAGAAGCTGCTCCTGCTA	
PI2R	1,802,093	GCTAGGAAGTGGGTTGGATG	

^a*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 株(GenBank Accession number, NC_006570.2)のゲノム上の位置

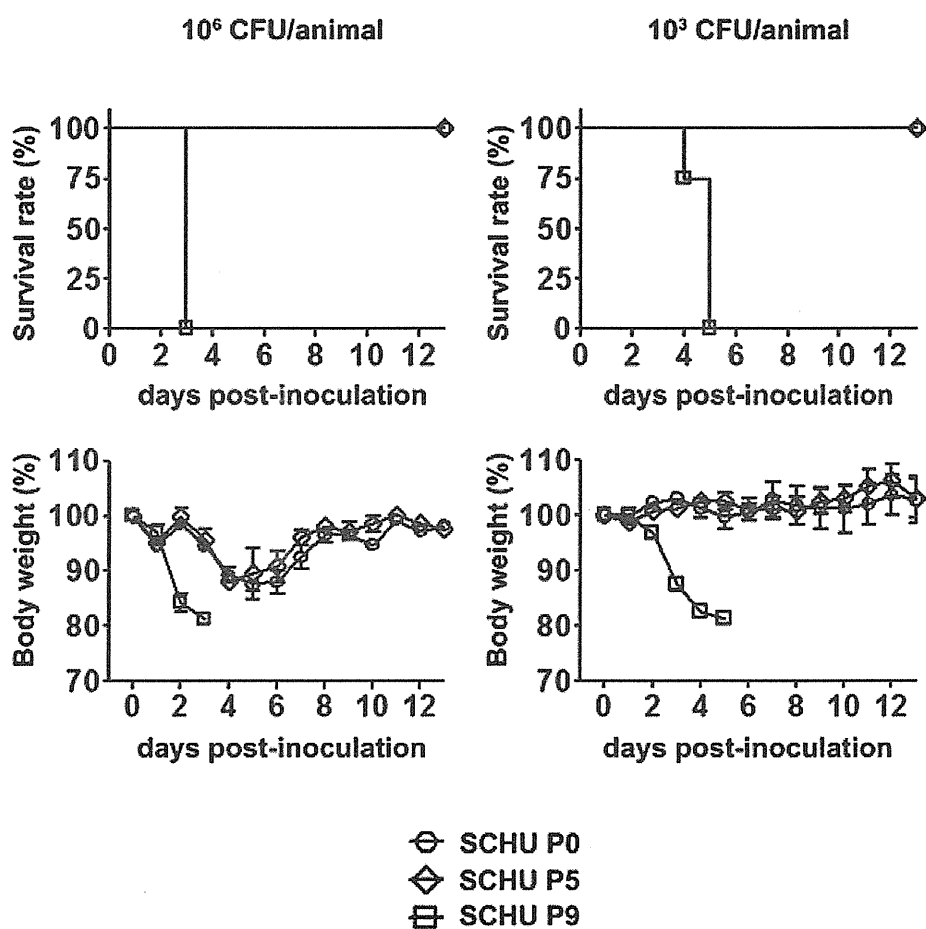


図1.弱毒および強毒性野兔病菌接種マウスの生存率と体重変動

表 2. SCHU P0、P5、P9 株の次世代シーケンス解析の結果

ゲノム上の位置 ^a			検出された変異配列 ^b						次世代シーケンス解析のリード数 ^c						Genetic information on variation			
挿入	欠失	鎖	P0		P5		P9		P0		P5		P9		locus tag	遺伝子シンボル	遺伝子名称	
			SCHU S4 レファレンス 配列	SCHU S4 同一 配列	変異 配列	SCHU S4 同一 配列	変異 配列	SCHU S4 同一 配列	変異配 列	SCHU S4 同一 配列	変異配 列	SCHU S4 同一 配列	変異配 列	SCHU S4 同一 配列				変異配 列
	635245- 635239	-	ΔAAAAAA	-	AAAA AA	-	AAAA AA	-	AAAA AA	0	263	0	251	0	299	FTT_0615c	-	metal ion transporter protein
	796219 - 796214 1394871 - 1394879 or 1788206 - 1788214	-	ΔAAAAA	-	AAAA A	-	AAAA A	-	AAAA A	0	138	0	142	0	185	FTT_0776c	md	ribonuclease D
	1540417 - 1540425	+	ΔAAAAAA A	-	AAAA AAAA	-	AAAA AAAA	AAAAA AAAA	AAAA AAAA	0	401	0	388	304	218	FTT_1354 or FTT_1709	pdp C1 or pdp C2	hypothetical protein
	1759054 - 1759179	+	AAAAAA A	-	AAAA AA And AAAA AAA	AAAAA AAAA	AAAA AAAA AA	AAAAA AAAA AAAA	AAAA AAAA AA	0	291 and 3	4	213	2	243	Intergenic region (FTT_1486c - 1487)		
	1828482 - 1828479	-	CGTTTAGG AAC TATTA TATAGTTT TIAGAATA AAAAATA TTTTTTA ATTTTGGT TCCTCAG CATGATAC TTTATCAA ACATTTAA GTCCTTGT GGCTTCTC ACTAAGTG TCTTGGGT AAAGAA	+	CGTTT AGGA AGGG TAAA GAA	-	CGTTT AGGA AGGG TAAA GAA	CGTTT AGGA AGGG TAAA GAA	CGTTT AGGA AGGG TAAA GAA	0	268	0	187	0	247	Intergenic region (FTT_1689c - 1690)		
	1828482 - 1828479	-	ΔAAA	-	AAA	-	AAA	-	AAA	0	253	0	186	0	214	FTT_1738c	kdp B	potassium-trans porting ATPase B chain

^a *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 株 (GenBank Accession number, NC_006570.2) におけるゲノム上の位置。

^b 太字は変異配列を示している。

^c リード数は、*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 株のシーケンスにマップされた数を示している。

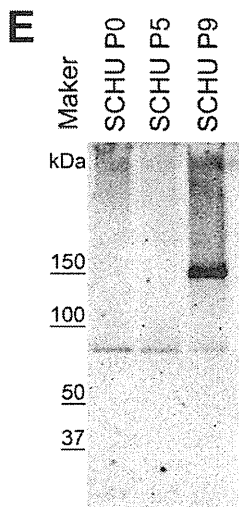
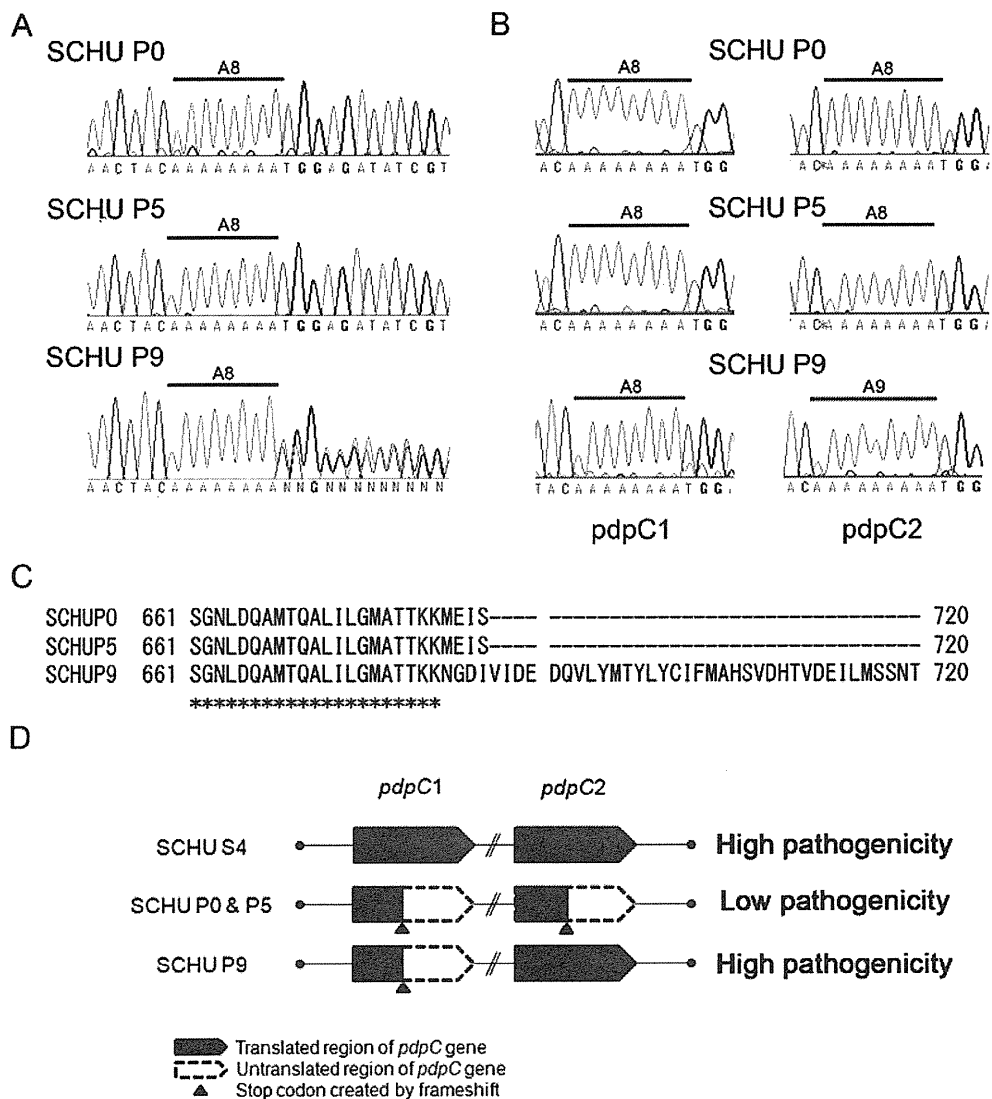


図 2. 弱毒および強毒性野兔病菌における *pdpC* 遺伝子のシーケンス解析。(A) 野兔病菌 SCHU 株に 2 重コードされている *pdpC1* および C2 遺伝子を区別せずに増幅後、シーケンス解析を行った。SCHU P9 株のみ A が 8 個連続した後、乱れた波形が検出され、*pdpC* 遺伝子の配列が 2 種類混ざっている可能性が示唆された。(B) Long PCR と nested PCR を併用し、*pdpC1* および C2 を個別に増幅後、シーケンス解析を行った。SCHU P9 株の *pdpC2* 遺伝子のみが A が 9 個連続する野生型のシーケンスを保持していることが明らかとなった。(C) 各株の *pdpC2* 遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列。弱毒性 SCHU P0 および P5 株は、A が 1 個欠損していることによりフレームシフトが発生し、約半分の大きさの PdpC タンパク質しかコードしていない。一方、SCHU P9 株は、全長をコードしていることが予測された。(D) 各株の *pdpC1* および C2 遺伝子の模式図。黒い部分は正常に翻訳される領域で、白い部分は非翻訳領域。(E) 抗 PdpC ポリクローナル抗体を用いた各株のウエスタンブロット解析。SCHU P9 株のみが正常な大きさの PdpC タンパク質を産生しているのに対して、弱毒性 SCHU P0 および P5 株では半分の大きさの PdpC タンパク質しか生成していなかった。

エキノコックスに関する研究

研究分担者 森嶋康之（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

研究協力者 杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部 第二室長）

要旨 ヒトの感染時における早期診断システムの確立ならびに感染源となる動物での寄生虫の発育を阻害する分子標的治療薬の開発を目的とし、エキノコックスの各発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定するために次年度以降に計画しているトランスクリプトーム解析に使用する DNA マイクロアレイのデザインと合成を行った。

A. 研究目的

エキノコックス症は、エキノコックス属条虫の幼虫寄生によって引き起こされる人獣共通寄生虫症で、ヒトをはじめとする中間宿主動物に致死的な転帰をもたらす。このような強い病原性は一般的な条虫幼虫感染症と異なるものであるが、その差異は本属条虫に特異的な幼虫形態である原頭節の無性生殖能にあると考えられている。すなわち、中間主体内において原頭節は無性的に増殖していく。ところが、原頭節はイヌをはじめとする終宿主動物に経口摂取された場合、同発育ステージである原頭節へと再分化するのではなく、次の発育ステージである成虫へと変化し、有性生殖を行って虫卵を産生する。本研究は、このエキノコックスの原頭節が持つ二方向性の分化能に焦点をあて、はじめにその方向決定に関わる遺伝子の発現および制御の機構の分子レベルでの解明を試みる。また、その成果にもとづき、主体内における正常な分化や発育の方向を人為的に誤ら

せることによって寄生虫を排除する新規駆虫薬の開発に向けた基盤的知見を集積することを目的とする。

B. 研究方法

エキノコックス属条虫に関するゲノム情報として、現在英国の Sanger Institute が不完全ながらデータベースを公開している。本研究では先行研究であるこのデータベースを利用することとした。

まず、発現候補領域を検出するため、以下の手順によって遺伝子予測作業を実施した。すなわち、NCBI よりエキノコックス配列 (EST およびタンパク質) を取得、タンパク質をゲノム配列へアライメントして学習セットを作製した。この学習セットを用いて遺伝子予測ソフトウェア (GlimmerM) の学習を行った。この学習済み遺伝子予測ソフトウェアを用いて遺伝子予測を実施した。得られた発現候補配列は BLAST を用いた相溶性検索によってアノテーション付けを行った。

DNA マイクロアレイ用プローブの設計は次の方法によって実施した。すなわち、上記遺伝子予測により得られた発現候補領域の配列を含む全配列をマージしたのち、センス鎖の予測ならびに設計不可配列の除去を行った。次いで短い設計対象配列をクエリとした相同性検索とクラスタリングを行い、DNA マイクロアレイに搭載するプローブの設計と選別を実施した。

C. 結果

遺伝子予測解析の結果、発現候補領域として 14,701 箇所の配列を検出した。これと NCBI エキノコックス配列 10,869 本および mRNA 配列 52,744 本とを合わせた計 78,314 本の配列をマージし、相同性検索ならびにクラスタリングによって整理した結果、プローブとして 50,521 配列が設計された。

D. 考察

エキノコックスの原頭節が示す二方向性分化は、従来から研究者の強い関心を集め、*in vivo* あるいは *in vitro* の実験によってその現象としての特徴が報告されてきた。しかしながら、どのような機序によって分化が制御されているのかはいまだ明らかにされておらず、発育ステージに特異的に発現する遺伝子群の網羅的な同定を試みる解析は本研究が世界で初めて試みられることとなる。

本研究が目指している原頭節の分化関連遺伝子群の特定は、エキノコックス症の感染予防や治療において以下のような新たな展開につながることを期待される。

すなわち、中間宿主では原頭節から原頭節へと向かう分化を阻害できれば、有効な化学療法剤への応用が期待できる。また、終宿主では原頭節から成虫への分化を阻害できれば、

中間宿主への伝播を根絶が可能となるであろう。

E. 結論

エキノコックスの発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定し、その制御機構を解析することを目的として、公共データベースで公開されているゲノム情報を用いて遺伝子予測を行い、マイクロアレイに搭載するプローブの設計を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 22 年度 分担研究報告書

土壌中の *Bacillus* 属菌の分離・同定法の確立

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨：土壌中の *Bacillus cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別法の確立を行うため、国内各地から土壌を採取・収集した。今後、詳細な遺伝学的同定および細菌学的分類を行っていく予定である。

A. 研究目的

炭疽が発生した際に臨床検体を用いた起因菌同定はヒトや動物で必須である。しかしながら、周囲環境に由来したものであるかどうかなど感染経路を調査するためには、*Bacillus* 属菌が芽胞として生息する土壌が重要な検査検体となる。現在、炭疽は国内で発生が見られない疾患であるが、芽胞として数十年間は土壌中に生存出来ると考えられていることから、国内の土壌中に炭疽菌の芽胞がどの程度存在するかについて調査することは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。

土壌中には、炭疽菌や、炭疽菌と遺伝的に非常に近縁である *B. cereus* を含む、いわゆる *Bacillus cereus* group を構成する菌種群の芽胞が多数存在していると考えられているが、これまでにどの程度これらの菌種群が土壌中に存在しているか、どのように分布しているかについての知見は得られていない。また、菌の培養を阻害する物質が多く含まれる土壌から効率良く *B. cereus* group 構成菌種群を分離同定する方法についても選択培地の選択、培養法の検討などが必要である。

本研究では、国内各地から採取・収集した土壌中の *Bacillus cereus* group 菌種群の網羅的検索および分離同定と炭疽菌芽胞および炭疽菌との鑑別法の確立を行うことを目的としている。

B. 研究方法

国内各地域の土壌を採取・収集する。

①これらの土壌から抽出した DNA を鋳型に、16S rDNA の variable region や *B. cereus* group 特異的プライマーを用いて PCR 増幅を行う。得られた PCR 産物について網羅的にプラスミドベクターに組み込み、得られたクローンの当該組み込み遺伝子領域の塩基配列を解読し、*B. cereus* group を構成する菌種群の同定を行う。

②培養法による *B. cereus* group を構成する菌種群の分離も同時に行い、培養法で得られる同定結果と塩基配列による遺伝子解析からの同定結果を比較することで、培養可能と培養不可能な *B. cereus* group 菌種群の存在の有無やその割合を明らかにする。

C. 研究結果

現在、地方衛生研究所等を通じて国内各地の土壌検体を収集しているところである。現時点では三地域から地域内各地の土壌(10 から 25 カ所程度)を確保した。

一地域の土壌について、蒸留水で懸濁したものを *Bacillus* 選択培地 (MYP agar、メルク社) と羊血液寒天培地 (日水) で培養したところ、多数のコロニーの増殖が確認された。これらの培地を用いれば、増殖可能な菌種の分離同定は可能であると思われる。現在も引き続いて菌種同定を行っているところである。

D. 結論

土壌検体から *Bacillus* 属菌と思われる菌を培養し分離することができることが確かめら

れた。

土壌検体の遺伝学および細菌学的分離・同定を順次行っていける目処がたったため、土壌の採取地域数を増やすために各地方衛生研究所への協力をお願いする予定である。

E. 研究発表

- Akiko Okutani, Tsuyoshi Sekizuka, Bazartseren Boldbaatar, Akio Yamada, Makoto Kuroda, Satoshi Inoue.
Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2010;72(1):93-97
- Ben Hatano, Takayuki Maki, Takeyuki Obara, Hitomi Fukumoto, Kohsuke Hagiwara, Yoshitaro Matsushita, Akiko Okutani, Boldbaatar Bazartseren, Satoshi Inoue, Tetsutaro Sata, Harutaka Katano. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism. *Japanese Journal of Infectious Disease*. 2010;63:36-40.
- Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, Kuroda M. Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in *Bacillus anthracis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jul;54(7):2787-92.
- Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S. Genome-wide SNP-typing method for species-strain identification of *Bacillus anthracis* among *B. cereus* group species. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Aug. 2010, 48(8):2821- 2829

F. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 22 年度 分担研究報告書

single chain variable fragment (scFv)と
Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法による
狂犬病ウイルス抗原検出法の開発

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
野口 章 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
杉浦尚子 国立感染症研究所獣医科学部、研究生

研究要旨：現在、世界の狂犬病患者の 95%はイヌの咬傷が原因とされており、流行地域の検査機関では、発症を疑うイヌ症例の診断を日常的に行っている。近年注目されている狂犬病ウイルス（RABV）抗原検出法のひとつに、測定が簡便で、高価な蛍光顕微鏡を必要としない Direct, rapid immunohistochemical test (DRIT) 法がある。本研究では、RABV 蛋白質を特異的に認識する single chain variable fragment (scFv)を、DRIT に応用し、その有効性と課題について検証した。scFv は、クローンごとに反応性に差が見られたものの、RABV 感染マウス脳の塗抹標本からウイルス蛋白質を特異的に認識することができた。今後は、感度のさらなる向上をはかるとともに、特異性についても検証を行う必要がある。scFv は、培養細胞や動物免疫を用いずに再生産が可能であることから、DRIT 法と組み合わせることにより、狂犬病流行地域の検査機関で有効な検査系になることが期待できる。

A. 研究目的

世界では毎年 55,000 人が狂犬病で死亡している。発生例の大半は発展途上国に集中しており、毎年 800～1,000 万人が曝露後予防（PEP:post-exposure prophylaxis）を受けている。狂犬病患者の 95%以上はイヌの咬傷が原因とされていることから、発症を疑うイヌが出現した場合に迅速かつ正確に診断し、地域における感染の広がりを平時から把握しておくことが不可欠である。また、咬傷被害者が、緊急措置として PEP を開始した場合でも、加害犬の診断が迅速になされることで、PEP を継続する必要性の有無を正しく判断できることから、無用な PEP によるコストを抑制することができる。

現在、発症を疑うイヌの診断には、主に脳スタンプを用いて、直接蛍光抗体法による狂犬病ウイルス（RABV）抗原検出が行われている。

しかし、本法には高価な蛍光顕微鏡が必要であることから、より安価な設備による検出法の開発が求められてきた。近年報告された迅速抗原検出法「DRIT 法（a direct, rapid immunohistochemical test）」は、検出用抗体としてビオチン標識抗体を用いるものである。発色基質を加えることにより、安価な光学顕微鏡で観察できることから、発展途上国を中心とした流行地域の検査機関での普及が期待されている。私たちは、これまでに RABV 実験株（CVS11 株）由来の組換え N 蛋白質をウサギに免疫して作製した高度免疫血清から、IgG を精製し（monospecific polyclonal Abs[mpAbs]）、これを用いた DRIT 法（mpAbs-DRIT 法）を開発してきた。本研究では、検出用抗体として、mpAbs の代わりに single chain variable fragment (scFv) の利用を検討した。scFv は、免疫グロブリンの VH

領域と VL 領域をリンカーでつないだ構造を持っており、scFv 遺伝子発現プラスミドを大腸菌に導入することにより、大量に発現・精製できるという利点を持っている。ひとたび scFv 遺伝子をクローニングできれば、哺乳細胞や動物免疫を利用せずに、再生産が可能となる。本研究は、このような利点を持つ scFv を DRIT 法に利用し、その応用性と技術的な課題を検証することを目指した。

B. 研究方法

1) 抗 RABV-N 蛋白質、抗 RABV-P 蛋白質 scFv の作出

クローニング：抗 RABV-N/P scFv 遺伝子のクローニングは、ヒト scFv 発現ファージディスプレイライブラリー”Tomlinson I+J”（英国 MRC Centre for Protein Engineering より分与）を用いた。大腸菌発現の精製 RABV-N、または・P を固相化した immunoplate に、上記ライブラリー液を 3 回繰り返して反応させて、吸着したファージを溶出した。

特異性の高い scFv クローンの選択：上で溶出したファージに対し、RABV-N または・P を固相化した immunoplate で ELISA を行い、反応性の高いクローンを選択した。クローンは、scFv 遺伝子のシークエンシングを行ったうえで、塩基配列の異なる独立したクローンのみを選択した。

scFv の大量発現・精製：scFv 発現ファージミド pIT2 を、大腸菌 HB2151 に導入して大量発現を行った。scFv の C 末端 His タグを利用して Ni-NTA Agarose (Qiagen) で精製を行った。

2) 抗 RABV-N/P scFv のビオチン標識

作出した scFv (200 μ g) を Biotin Labeling Kit-NH₂ (同仁化学研究所) で標識した。方法は、添付プロトコールに従った。

3) DRIT 法

RABV 感染／非感染マウス脳の塗抹標本を、陽性／陰性検体として用いて、DRIT 法を行った。DRIT 法のプロトコールは図 1 に示した。今回

は、塗抹標本の固定に 100%アセトンを用いた。ビオチン標識抗体として、抗 RABV-N scFv を 1 種類 (scFv-N1)、抗 RABV-P scFv を 4 種類 (scFv-P19, P38, P80, P115) を×10、×50、×100 希釈したうえで使用した。陽性対照として、抗 RABV-N mpAbs をビオチン標識し、×500 希釈したものを使用した。

C. 研究結果

上記希釈倍率 scFv による染色像のうち、発色・コントラストの面で最善だった像を選び、写真を撮影した (図 2)。クローンによって、反応性に違いはあったが、全ての scFv において、RABV-N または RABV-P に特異的な抗原の発色像が認められた。その一方で、検出された抗原の密度は、陽性対照よりも低かった。

D. 考察

本研究は、ビオチン標識 scFv を DRIT 法に用いた初めての研究である。抗 RABV-N scFv を 1 種類 (scFv-N1)、抗 RABV-P scFv を 4 種類 (scFv-P19, P38, P80, P115) を用いた結果、全ての scFv において、RABV-N または RABV-P に特異的な抗原の発色像が認められた。このことから、技術的には、scFv を DRIT に使用可能であることが確認できたと言える。

しかし、検出された抗原の密度が、陽性対照よりも低かったことから、感度の面ではまだ改善の余地があると考えられる。この一部は明らかに、scFv の構造的な特徴—すなわち、陽性対照に用いた mpAbs よりも抗原結合領域が 1 つ少なく (scFv は 1 価、mpAbs は 2 価)、認識できる抗原の多様性が少ない (scFv はモノクローナル、mpAbs はポリクローナル) ことに起因するものである。感度の向上をはかるための現実的な方法としては、複数のクローンの scFv を同時に用いて (ポリクローナルとして) 利用することが挙げられる。また、各 scFv 間で発色の程度が異なっていたが、これは抗体としての affinity の差だけでなく、ビオチンの標識効率に差があった可能性も否定できない。効率がよく、かつ再現性の高いビオチン標識 scFv を得るためには、scFv とビオチンの融合蛋白

質として発現させるという方法も有効だと考えられる。

E. 結論

ビオチン標識 scFv を DRIT 法に利用可能であることが確認できた。測定が簡便で、高価な蛍光顕微鏡を必要としない DRIT 法と、培養細胞や動物免疫を用いずに再生産が可能な scFv を組み合わせることで、狂犬病流行地域における有効な検査系として期待できる。今後は、感度の向上をはかるとともに、多くの野外検体に応用することで、特異性の検証も行う必要があると考える。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

2 口頭発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」

分担研究報告書

ヒト狂犬病の治療に関する研究

研究分担者 菅沼 明彦 東京都立駒込病院感染症科

協力研究者 高山 直秀 東京都立駒込病院小児科

協力研究者 柳澤 如樹 東京都立駒込病院感染症科

研究要旨

狂犬病は、致死的な脳炎をきたす人獣共通感染症であり、発病するとほぼ全例が死に至る。発病後の治療は未確立だが、近年、新たな治療法を模索する動きがみられる。輸入狂犬病発生の際に、日本国内には、狂犬病の治療、院内感染対策に関する資料が非常に乏しいことが明らかとなった。今年度は狂犬病治療を考える基礎資料として、海外から報告された文献に基づき、狂犬病救命例、治療法、院内感染対策について暫定的にまとめた。これまで報告された狂犬病発症後の救命例は少数に過ぎない。6例目の救命例は狂犬病ワクチンや抗狂犬病免疫グロブリン（RIG）の投与を受けず、人工呼吸管理及びケタミン、ミダゾラムなどの投与による強力な鎮静処置を受けた後に救命され、社会復帰できた。この症例での治療を基礎として、Milwaukee rabies protocol(MRP)が、ウイスコンシン大学より提唱され、その後、2008年に同様の治療を受けた2例の救命例が報告された。しかし、それらの詳細は依然として明らかではなく、かつ治療失敗例の報告も数多くあることから、MRBは確立された治療法として認められていない。2009年に米国より、軽度の症状のみを呈し、自然に回復したと考えられる狂犬病症例が報告され、宿主及び狂犬病ウイルスの曝露量や毒性が予後に大きく影響する可能性が示唆された。WHOは、狂犬病が確定診断された症例に対し、苦痛の軽減を目的とした緩和治療を推奨しており、人工呼吸器の使用などの侵襲的処置は避けるべきであるとしている。

A. 背景

狂犬病は、古代より知られたウイルス性の人獣共通感染症である。神経親和性を有し、末梢神経より侵入し脊髄から脳に至り、脳炎をきたす。感染経路は、感染動物による咬傷が大多数だが、エアロゾル、臓器移植による感染も報告されている。狂犬病は、

適切な咬傷部位の処置と、狂犬病ワクチンを用いた曝露後免疫により発症予防が可能である。しかし、ひとたび発症すると、ほぼ全例が死に至る。これまで、種々の治療法が試みられているが、発症後の救命例はわずかにすぎない。

このような現状を踏まえ、治癒をめざす

積極的治療が望ましいのか、患者の苦痛緩和・除去を主眼に置く緩和的治療が望ましいのか、現在まで議論が続けられている。

B. 狂犬病患者の治療方針

狂犬病患者に対する治療方針として、治癒を目指す積極的治療か、患者の苦痛の軽減・除去に主眼を置く緩和的治療か、現在統一された見解はない。

気管内挿管、人工呼吸器などの集中治療により、狂犬病患者の生存期間延長は認められている。(平均5日から3週間へ延長) また、生存期間の延長により、経過中に様々な合併症の発現が確認されている 1) 3) 25)。

2003年米国ウイスコンシン大学において、人工呼吸管理、抗痙攣薬に加え、特異的治療としてケタミン、リバビリジン、アマンタジンを使用して狂犬病患者の救命に成功した。この治療を基に、Milwaukee Rabies Protocol(MRP)が作成され、これに準じた治療が各地で行われている。しかし、同様の治療を実施した他の症例は、生存期間の延長は認められたものの、全例が死の転帰をとり、有効性は確認されなかった 6)。

2008年、ブラジル及びカンボジアからより、上記と同様の治療を受け救命された症例が報告された 37)。

しかし、これらの臨床経過、治療内容などの詳細を含む新たな報告は依然として認められておらず、MRPの有効性を支持するものとは言い難い。

Alanらは、現時点では積極的治療を支持する根拠は乏しく、通常は緩和的治療が選択されるとしている 4)。

また、狂犬病の治療を目標とした積極的治療が考慮されるのは、特殊な状況下で、医療者及び本人または家族の希望があり、必要な条件を満たし

た場合である。積極的治療をすすめる上で条件として以下の点があげられている 4)。

- 1: 狂犬病発症前に狂犬病ワクチンが接種されている。
- 2: 発症早期の症状(咬傷部位の疼痛・知覚異常など)にとどまっている
- 3: 元来健康で、基礎疾患を有さない
- 4: 家族が、治療が不成功に終わる可能性が非常に高く、神経学的後遺症を残す可能性を受容できる
- 5: 治療を実施する医療機関が、十分な医療スタッフと設備を有する

上記の提言は、ワクチン接種を行わずに救命された 2003年米国の症例が報告される以前のものであり、「1: 狂犬病発症前に狂犬病ワクチンを接種されている。」については、検討の余地はある。しかし、それ以前の救命例は、全例に狂犬病ワクチンを発症前(曝露前免疫1例、曝露後免疫4例)に接種しており、発症前のワクチン接種が、発症後の回復に有利となる可能性はある。

WHOの狂犬病専門家会議の検討では、現時点では、各種治療薬の有効性は確立されておらず、狂犬病が確定した時点で、侵襲的治療を回避すべきであるとしている。

診断確定後は、緩和的にバルビツール、モルヒネなどで鎮静を図り、気管内挿管、人工呼吸器管理などは行わない方針を示している。

新たな治療法を模索するため、本人及び家族の同意のもとに、専門的施設にて実験的治療が試みられる際には、患者への多大な経済的負担は避け、救命しえたとしても重篤な後遺症が残る可能性について家族の承諾が必要であるとしている 5)。

C. 狂犬病救命例

これまで、狂犬病発症後に救命されたと報告された症例は6例である(5)17)。(表1)感染地は、米国が3例と最も多く、性別は男性3例、女性3例、年齢は6~45歳である。感染経路は、動物咬傷5例(イヌ3例、コウモリ2例)、実験室内感染1例、5例はワクチン接種歴を有し、うち1例は曝露前免疫を受けていた。後遺症は5例に認められ、うち2例は高度の障害を残し、救命後数年以内に後遺症を原因として死亡している。

狂犬病救命例には、狂犬病ワクチンの副反応の可能性を否定できない症例が含まれている点や、全症例が狂犬病ウイルス抗体価(特に髄液中抗体価)による診断であり、ウイルスを直接同定した症例がない(5)などの問題点が指摘されている。そのため、すべての救命例が、狂犬病であったかを疑問視する意見もみられる。

上記6例以外に、発熱、咬傷部疼痛、感覚障害、不安感、狂水症などの臨床症状から狂犬病と診断され、救命に至った2症例が報告されている。しかし、いずれも抗体検査・抗原検査が未実施であるため、狂犬病救命例として公認されていない(18)。

また、2008年に2例の狂犬病発症例で、MRBに準じた治療を受け救命された症例が報告されたが、その詳細は不明である(37)。

1. 第1例目(17)19)

米国での6歳の男子。左親指をコウモリにかまれる。そのコウモリが実験室内検査より狂犬病であることが判明。受傷4日後より、アヒル胚細胞由来狂犬病ワクチンの接種を開始。

受傷後20日目に発熱、髄膜刺激症状。異常行動も出現し、その後昏睡となる。巣症状、痙攣、循環器・呼吸器合併症も認められた。その後、神経所見は良好な回復を認めた。脳生検は、脳炎に一致した所見を呈した。3か月後の血清中和抗体価は、63,000倍を示し、髄液中の抗体価も高値であった。狂犬病ウイルスは、脳、髄液、髄液のいずれからも検出されなかった。

2. 第2例目(17)34)

アルゼンチンの45歳女性。イヌにより左腕を受傷した。そのイヌは、受傷させた後に神経症状が現われ、4日後に死亡した。受傷10日後より、乳のみマウス脳由来ワクチンの接種を開始した。ワクチンを14日間連日接種した後に、さらに2回の追加接種を行った。受傷21日後(ワクチン接種12日目)、受傷部位に知覚異常が出現し、その範囲は拡大し、疼痛を伴うようになった。受傷後31日目に四肢麻痺と反射亢進のため入院となる。四肢筋力低下、上肢の振戦、小脳症状(協調運動障害、失調など)全身性ミオクローヌス、下肢の反射亢進を認めた。髄液所見は、細胞数5、タンパク0.65g/L。3か月後の血清狂犬病抗体価は640,000倍であり、髄液抗体価も高価を示した。唾液、髄液、角膜のいずれからも、狂犬病ウイルスは分離されなかった。2回の追加接種の後に、急速に神経学的異常が出現し、神経症状の改善に2-3か月を要した。報告では、ほぼ完全な回復をみたとされているが、詳細な記載はない。本例は、典型的な狂犬病の臨床像と異なり、乳のみマウス脳由来ワクチンによる脳炎の可能性も指摘されている。

3. 第3例目(17)

米国の32歳男性。狂犬病ウイルスを扱う研究員であり、1977年にアヒル胚細胞由来狂犬病ワクチンにより曝露前免疫を受けた。発症5か月前の血清中和抗体は、32倍であった。発症2週間前に、エアロゾルによる狂犬病ウイルス（ワクチン株）の曝露を受けた。

初期症状として、倦怠感、頭痛、発熱、悪寒、嘔気を認め、その後間欠的な幻覚を伴う傾眠が現れた。発症6日後に失語、腱反射亢進、原始反射が認められ入院となる。髄液検査は、白血球 $230/\mu\text{l}$ （95%単核球）、タンパク 1.17g/l などを示した。入院後、症状が悪化し昏睡状態となる。血清中和抗体価は、64000倍へ上昇し、経過中に175,000倍まで上昇した。髄液抗体価の上昇も認められた。皮膚生検、角膜塗抹標本から、狂犬病ウイルスは検出されなかった。発症4か月後、歩行可能となるが、失語、痙性麻痺が残存した。本例は、曝露前免疫を受けながらも、狂犬病を発症した最初の症例となった。また、詳細が報告された4例目のエアロゾル感染例である。

4. 第4例目 17)35)

メキシコの9歳男性。顔面をイヌに咬まれた後、創部処置、ペロ細胞狂犬病ワクチン接種が行われた。しかし、抗狂犬病免疫グロブリンは投与されなかった。受傷19日後より発熱、嚥下障害が出現。その後、様々な異常な神経学的所見と、痙攣が出現したが、恐水症や、吸気時の痙攣は認めなかった。入院後、意識状態の悪化を認め、昏睡となり数日間人工呼吸管理を要した。髄液所見は、白血球 $184/\mu\text{l}$ （単核球65%）を呈した。唾液、皮膚、角膜から狂犬病ウイルスは検出されなかった。血清中和抗体価

は受傷39日目に34,800倍と上昇し、髄液抗体も高値を示した。後遺症として、四肢麻痺、視覚障害などを認めた。約4年後に死亡した。

5. 第5例目 17)36)

インドの6歳女性。顔面、手をイヌに咬まれた。咬んだイヌは4日後に死亡した。トリ胚細胞狂犬病ワクチンを0日、3日、7日に接種されるが、創部の処置、免疫グロブリン投与は行われなかった。受傷14日後より、発熱、嚥下障害、幻覚を認めた。ワクチンによる神経障害と考えられ、メチルプレドニゾン投与、ヒト2倍体細胞ワクチン接種が行われた。その後、唾液分泌増加、痙攣が出現し、昏睡状態となった。頭部MRIは、大脳皮質、基底核、脳幹部にT2強調像にて高信号領域を認めた。髄液は、多核球優位の細胞数増多を認めた。血清抗体価は発症110日目に31,200倍（7,800IU/ml）まで上昇し、髄液抗体価は18,200倍（4,550IU/ml）であった。皮膚生検、角膜からウイルス抗原は検出されなかった。重篤な後遺症が残り、四肢の筋固縮、不随意運動、後弓反張が認められた。2年後に死亡した。

6. 第6例目 17)31)

米国の15歳女性。左第2指をコウモリに咬まれる。創部の処置は、オキシドールで行われた、その際に医療機関は受診しなかった。約1か月後左手の疼痛としびれを自覚し、それが3日間続いた後に両側第6神経障害による複視、落ち着きのなさ、嘔気、嘔吐が認められた。頭部MRIは正常であった。症状発現4日後に髄液検査を行い、白血球 $23/\mu\text{l}$ （リンパ球93%）とタンパク 50mg/dl を認めた。その後、発熱、眼振、

左上腕振戦、唾液分泌過多が認められた。発症5日目に3次医療機関へ転送された。再度実施された頭部MRIでは異常を認めなかった。転院初日の血清および髄液の中和抗体はそれぞれ102倍、47倍であった。その後両者ともに上昇を認め、1,183倍、1,300倍となった。皮膚、項部、唾液のいずれからもウイルスは検出されなかった。人工呼吸管理となり、ケタミン、ミダゾラムを投与され、てんかん波抑制のためフェノバルビタールが加えられた。また、リバビリン、アマンタジンを経腸的に投与された。後遺症を残したが改善を認め退院した。退院後もさらに神経症状の改善を認められた。2007年には、歩行障害、構語障害などが残存するものの、高校生活を卒業し、大学進学試験にて平均以上の点数を得たことが報告された(21)。本例は、発症前にも発症後にも狂犬病ワクチン接種を受けずに救命された初めての症例であった。

D. 狂犬病の合併症とその治療

これまでの症例の蓄積により、狂犬病の臨床経過が明らかになってきている。集中治療により生存期間の延長した症例が増加し、経過中に代謝系、循環器系、呼吸器系などの多彩な合併症が出現することが確認された(25)。

6例目の救命例の治療を行ったウイスコンシン大学により、狂犬病患者に対する治療指針が示され、Milwaukee rabies protocol (MRP)として公開されている(28)(31)(38)。MRPには、これまでの症例報告から、合併症とその発病日、推奨される治療が示されている。これらの治療は、特異的な治療により治癒を目指すことが前提であり、気管

内挿管、人工呼吸管理、心臓ペースメーカーなどの侵襲的処置が含まれている。積極的治療を目指すのか、緩和的治療を目指すのか、統一された見解がない現状では、合併症治療をどこまで行うかについても議論が分かれると思われる。(表2)

E. 狂犬病に対する特異的治療

これまで、狂犬病に対する特異的治療が検討されているが、実験室レベルでの有効性を示した薬剤はあるが、ヒト狂犬病の治療において効果の再現性が示されたものはない。前述したウイスコンシン大学を中心としたグループが特異的治療を積極的に行っており、MRPに特異的治療が述べられている(30)。

以下にその概略を記す。

1. ケタミン

ケタミンは、非競合性N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体阻害剤であり、一般的に臨床では、解離性麻酔薬として、麻酔科領域で使用されている薬剤である。

感染ラット神経細胞において、ケタミンを作用させることにより、狂犬病ウイルスの核タンパクおよび糖タンパクの合成抑制が確認したとの報告がみられた(8)。

しかし、同様の感染神経細胞を用いた実験において、ケタミンに神経保護作用は認めなかったとの報告もあり、結果は一定していない。マウスの脳内に狂犬病ウイルスに接種した実験系では、感染した神経細胞数、発現した狂犬病ウイルス量、及び死亡率に有意差を認めなかった(9)。

2. リバビリソ

リバビリソは、1970年代に合成されたプリンヌクレオシドアナログであり、これまでに、C型肝炎ウイルスをはじめとして、広範なウイルス活性を有することが知られている(27)。

狂犬病にも応用され、単独で投与された例がみられたが、効果は認めなかった(11)。

MRPでは、免疫応答を抑制する可能性から、その使用が禁忌とされた(38)。

3. インターフェロン・アルファ

狂犬病患者の体液および脳組織のインターフェロンが低値であることから、高容量のインターフェロンが治療に有望との報告(12)や、感染したサルにおいて、インターフェロン投与群で生存率上昇を認めた報告がある(10)。しかし、Warrellらは、ヒト狂犬病3例にインターフェロンを投与したが、いずれも2週間以内に死亡し、有効性を見出し得なかったことを報告している(11)。

4. 抗狂犬病免疫グロブリン

狂犬病ウイルスの早期の排除を目的に、抗狂犬病免疫グロブリン(RIG)を試みられている。しかし、免疫グロブリンは通常血液脳関門を通過できないため、(14)

狂犬病患者の中樞神経系にどの程度移行し、効果を発揮するのか不明である。また、髄腔内投与の安全性、有効性も分かっていない(13)。

ウマ抗狂犬病免疫グロブリン(ERIG)髄腔内投与を実施した症例では、生存期間延長を認めたが、救命には至らなかった(1)。

曝露前・曝露後免疫を行わず脳炎型狂犬病を発症し、ヒト抗狂犬病免疫グロブリン

(HRIG)が投与された症例では、急速に四肢麻痺出現し、発症15日目に死亡したことが報告された(14)。これは、狂犬病発症後のImmunoglobulin投与が臨床経過をむしろ悪化させる可能性を示唆している。

5. 狂犬病ワクチン

狂犬病を発症した患者に対して、液性免疫および細胞性免疫の誘導を目的として、筋肉注射による狂犬病ワクチン接種が行われているが、明らかな効果は認められていない(2)。

通常の接種では、抗体検出までに1週間あるいはそれ以上の期間を要するため、複数個所の皮下接種を考慮すべきとの意見がみられる。しかし、このような強化したワクチン接種の有効性について、一致した見解は得られていない(4)。

6. 副腎皮質ステロイド

狂犬病を感染させたマウスに対してステロイドを使用したところ、死亡率の上昇と潜伏期の短縮が認められている。このため、ヒト狂犬病への使用は、副腎不全を合併している例などを除いて原則禁忌と考えられている(20)。

7. Milwaukee rabies protocol (MRP)

これまでに、人工呼吸管理を含めた全身管理に加え、上記の薬剤を含んだ様々な治療が試みられているが、多くは救命に至っていない(26)。

2003年米国での救命例では、人工呼吸管理に加え、ケタミン、ミダゾラム、フェノバルビタールにより、神経保護、けいれん波抑制や、自律神経系の抑制を図り、抗ウ

イルス剤としてリバビリン、アマンタジンを経腸投与された。これを基に、MRP が作成された。MRP の概要は、支持療法、神経保護と治療的昏睡、特異的抗ウイルス療法、免疫調整、治療期間の項目よりなっており、各項目に関する治療についての見解及び実施の可否が示されている。

世界各地で MRP に準じた治療がおこなわれているが、その後の生存例は報告されていない。Hemachudha の報告では、33 歳の狂犬病発症者に MRP に準じた治療を行ったが、入院 8 日目に死亡した (29)。

2006 年米国で発生した 2 症例に対しても MRP による治療を行ったが、死の転帰をとった (24)。

2010 年 1 月時点において、ウイスコンシン大学の治療チームに登録された 20 症例の中で、先に示した詳細不明である狂犬病救命例の 2 例が生存例とされており、治療の再現性には疑問が残る状況である (38) (39) (40)。

これらの結果から、MRP の理論的根拠が明らかでなく、実験室レベルでの研究の蓄積が必要との批判的意見も少なくない (29)。

また、2009 年に米国より、軽度の症状で集中治療を要さずに軽快した症例が報告された。この症例はこれまでの救命例と同様に、狂犬病ウイルスは検出されず、抗体によって診断されたものであった。このことは、治療内容ではなく、宿主の免疫応答、狂犬病ウイルスの曝露量、感染経路、毒性の違いなどが、予後に影響を与えている可能性が考えられる。 (41)

MRP は現在も検討が加えられており、2007 年 9 月に、version2.1 示され、2009 年 6 月に Version3.1 が公開された (31) (30)。

Version3.1 の主な変更として、tetrahydrobiopterine (BH4) の適応の変更、昏睡療法に関する薬剤の推奨、脳血管痙縮に対するカルシウム拮抗薬の使用、の 3 点があげられる。Version2.1 では、神経伝達物質に関連する酵素に必須とされる BH4 の投与が推奨されていたが、Version3.1 では、低血圧などが出現する例に適応が限定された。昏睡療法は、ケタミン、ベンゾジアゼピン系薬剤、アマンタジンが推奨されている。バルビツール酸は、リンパ球減少を惹起する可能性により、必要時のみの使用となった。また、リバビリンの使用は、患者の免疫応答を抑制し、臨床症状を悪化させる可能性から禁忌となった。脳血管痙縮を認める患者に予防的に、血管拡張薬であるカルシウム拮抗薬 (Nimodipine 国内未承認薬) の投与が推奨されている。

前回の変更に加えて、治療はより細部にわたり指示されている。しかし、MRP の忠実な実施には、厳重な全身管理及び合併症治療・特異的治療に相当の医療資源を要することが明らかである。また、MRP が理論のみに基づく点も多いことから、有用性の評価には、症例の蓄積が必要である。

MRP version3.1 の要点について、表 3 に示した。

F. 狂犬病の院内感染対策

狂犬病の院内感染対策について、これまでに示された文献は少なく、2004 年の WHO における専門家の検討で示されたものを以下に示した (32) (33)。

要点については、表 4 に記した。

狂犬病患者の治療・看護にあたり、医療

スタッフだけでなく、報道機関や一般住民の不安を惹起する可能性がある。他の多くの細菌やウイルスと比べて、感染リスクは高くないが、医療スタッフには、ガウン、ゴーグル、マスク、グローブ（Personal protective equipment PPE）の着用が求められる。特に、気管内挿管、吸引の実施時に、適切なPPE着用が重要である。ウイルスは、血液中には存在せず、唾液、髄液、尿とある組織内にもみ間欠的に出現する。

感染のリスクがあると考えられる医療スタッフに対しては、十分に調査した上で、狂犬病曝露前免疫が考慮される。他の感染症と同様に、狂犬病患者をケアする際は、適切な感染対策を徹底するように、医療スタッフの意識を高めることが重要である。

狂犬病患者を診療する特別な医療機関では、狂犬病患者にかかわる医療スタッフは、狂犬病曝露前免疫を行うべきである。ある医療機関では、狂犬病曝露後免疫を、組織培養狂犬病ワクチンを用いて0,3,7,14日と短縮したスケジュールで行っている。

生検や剖検などにおける、脳、脊髄の不用意な取り扱い（電気のこぎり、ドリルなどを用いた生検）は感染の危険性がある。そのため、このような操作では、ゴーグルや呼吸器防護具を用いるべきである。組織や

体液は、結核や肝炎などの他の感染症と同様に廃棄しなければならない。一般的に、狂犬病で死亡したヒトからの感染の危険性は低い。血液にはウイルスは含まれないが、中枢神経系、唾液線、筋肉になどの多くの組織にウイルスが存在する。また、唾液や尿にも存在する。遺体に防腐処置を施すことは勧められない。不注意な局所解剖（ネクロプシー）の実施は、粘膜への曝露や、エアロゾルの吸入を招く可能性があり、ガウン、フェイスマスク、ゴーグル、厚い手袋などのPPE着用により、感染を防御する。使用した器具は、オートクレーブまたは煮沸消毒が必要である。遺体は、早期に火葬または埋葬されることが勧められる。

G. まとめ

これまでヒト狂犬病に対して、様々な治療法が試みられているが、現時点では有効性が確立されたものは存在しない。また、これまで報告された救命例においても、感染ウイルスの毒性や宿主の免疫反応が予後に影響した可能性が指摘されている。今後もヒト狂犬病臨床例の検討と、狂犬病に関する基礎的研究の推進がヒト狂犬病治療の検討に不可欠である。

<文献>

- 1) Richard W. Emmons, et al. A case of human rabies with prolonged survival. *Intervirology*. 1973; 1: 60-72
- 2) SL Cohen, et al. A case of rabies in man: some problem in diagnosis and management. *BMJ*. 1976; 1: 1041-42.
- 3) Gode GR , et al. Intensive care in

rabies therapy. *Lancet* 1976; 2: 6-8

- 4) Alan C, et al. Management of rabies in humans. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36:60-3.
- 5) WHO expert consultation on rabies first report 2004. Management of rabies patients before and after death.
- 6) MJ Warrell, et al. Failure of interferon

- alfa and tribavirin in rabies encephalitis. *BMJ* 1989; 299: 830-3.
- 7) Porter RH, et al. Regional variations in the pharmacology of NMDA receptor channel blockers: implications for therapeutic potential. *J Neurochem* 1995; 64: 614-623.
- 8) Brian Paul Lockhart, et al. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1992; 36:1750-1755.
- 9) Simno C. Weli, et al. Rabies virus infection primary neuronal cultures and adult mice: failure to demonstrate evidence of excitotoxicity. *Journal of Virology*, 2006; 10270-10273
- 10) J. Hilfenhaus, et al. Effect of administered human interferon on experimental rabies in monkeys. *Infection and immunity*, 1975; 1156-8
- 11) MJ Warrell, et al. Failure of interferon alfa and tribavirin in rabies encephalitis. *BMJ* 1989; 299: 830-3.
- 12) Merigan TC, et al. Human leukocyte interferon administration to patients with symptomatic and suspected rabies. *Ann neuro*. 1984; 16: 82-7.
- 13) Alan C, et al. Management of rabies in humans. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36:60-3.
- 14) Hemachudha T, et al. Paralytic complications following intravenous rabies immune globulin treatment in a patient with furious rabies. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 76-77
- 15) GR Gode, et al. Treatment of 54 clinically diagnosed rabies patients with two survivals
Indian J Med Res. 1988; 88: 564-566
- 16) Madhusudana SM, et al. In vitro inactivation of the rabies virus by ascorbic acid. *Int J Infect dis*. 2004; 8: 21-5
- 17) Alan C. Jackson. *Human diseases. Rabies* 2nd edition. pp309-340
- 18) GR Gode, et al. Treatment of 54 clinically diagnosed rabies patients with two survivals. *Indian J Med Res*. 1988; 88: 564-566
- 19) Michael A. W. Hattwick, et al. Recovery from rabies. *Annals of Internal Medicine*. 1972; 76: 931-942.
- 20) Enright JB, et al. The effects of corticosteroids on rabies in mice. *Can J Microbiol* 1970; 16: 667-75.
- 21) William T, et al. Long-term follow-up after treatment of rabies by induction of coma. *N Engl J Med*. 2007; 357: 945-946.
- 22) Manuel J, et al. Failure to thrive, wasting syndrome, and immunodeficiency in rabies: a hypophyseal/ hypothalamic/ thymic axis effect of rabies virus. *Reviews of infectious diseases*. 1988; 10:S710-725.
- 23) S L Cohen, et al. A case of rabies in man: some problems in diagnosis and management. *British Medical Journal*. 1976; 1: 1041-42.
- 24) Human rabies—Indiana and